původní práce

FAKTORY PREDIKUJÍCÍ SELHÁNÍ ADJUVANTNÍ HORMONOTERAPIE U KARCINOMU PRSU, STUDOVANÉ NA SOUBORU PACIENTEK LÉČENÝCH TAMOXIFENEM.

FACTORS PREDICTING FAILURE OF ADJUVANT HORMONOTHERAPY OF BREAST CARCINOMA. A STUDY IN TAMOXIFEN TREATED PATIENTS.

PETRÁKOVÁ K.[1], NENUTIL R.[2], GRELL P.1, FABIAN P.[2], ZICHOVÁ I.[2], SVOBODA M.[1], PALÁCOVÁ M.[1], VYZULA R.[1]

[1]KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO
[2]ODDĚLENÍ ONKOLOGICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn
Východiska: V souvislosti se zaváděním inhibitorů aromatázy do adjuvantní léčby karcinomu prsu je často diskutována možnost predikce selhání léčby tamoxifenem z parametrů primárního nádoru. Proto jsme se pokusili ověřit některé z nich, uváděné v této souvislosti, v retrospektivní studii. **Materiál a metody**: Z pacientek klinického stadia I-III operovaných pro karcinom prsu na MOÚ v letech 1998-2000 byly vyhledány případy léčené v adjuvanci tamoxifenem pro dobu 5 let, případně do relapsu onemocnění. Na složených blocích z archivního parafinového materiálu, z těchto 179 případů byla provedena imunohistologická stanovení estrogenového receptoru alfa (ER), progesteronového receptoru (PR) a Ki67. Dále byla vyšetřena in-situ hybridizací amplifikace Her-2 a genu pro cyklin D1. Výsledky: 54 pacientek relabovalo během sledování. Z klasických prognostických parametrů jsou v jednorozměrné regresní analýze bezpříznakového přežití významnými rizikovými faktory přítomnost více než tří uzlinových metastáz (RR=4,5 p<0,001) a grade 3 (RR=2,3 p=0,035). Z biologických parametrů zvyšují riziko relapsu zejména amplifikace cyklinu D1 (RR=3,06 p<0,001), amplifikace Her-2 (RR=2,4 p=0,002) a negativita PR (RR=2,1 p=0,013). Ve vícerozměrném regresním modelu však vymizel význam negativity PR (RR=1,6 p=0,128) a vedle klinického stadia III proti I-II (RR=2,6 p=0,003) se uplatnila jen amplifikace cyklinu D1 (RR=2,7 p=0,001) a amplifikace Her-2 (RR=2,1 p=0,014). Pokud byly pacientky s adjuvantní chemoterapií posuzovány odděleně (N=77), žádný z klinickopatologických ani biologických rizikových parametrů nedosáhl statistické významnosti ani v jednorozměrné analýze. Ve vícerozměrné analýze pacientek bez adjuvantní chemoterapie (N=102) se vedle klinického stadia III proti I a II (RR=6,9 p=0,001) uplatnila významně pouze amplifikace Her-2 (RR=4,5 p=0,001). **Závěr**: Výsledky potvrzují prioritu klinického stadia jako prediktoru selhání adjuvantní léčby u pacientek s ER pozitivními nádory. Jako významné biologické parametry se jeví amplifikace Her-2 a amplifikace cyklinu D1. Jejich prediktivní hodnota však klesá pokud je pacientkám podána adjuvantní chemoterapie. Nelze tedy vyloučit, že cyklin D1 je spíš prognostickým, než prediktivním faktorem selhání adjuvantní léčby tamoxifenem.

Klíčová slova: karcinom prsu, tamoxifen, Her-2 geny, Cyklin D1, progesteron, receptory, přežití po terapii bez příznaků nemoci.

Summary
Background: The latest clinical trials indicate better performance of aromatase inhibitors, compared to tamoxifen, in adjuvant hormonotherapy of breast carcinoma. The identification of molecular markers, predicting resistance to tamoxifen, could help to identify patients, which are most likely to benefit from aromatase inhibitors in up-front adjuvant hormonotherapy. **Material and methods**: Tissue microarrays were constructed from archival paraffin blocks of primary tumors of 179 patients with estrogen receptor positive operable breast carcinoma in stage I-III, subsequently treated with tamoxifen for five years or until relapse, with at least 7 years follow up available. The amplifications of Her-2 and cyclin D1 genes were evaluated by fluorescence in-situ hybridization. The level of progesterone receptor (PR) and Ki67 were estimated by immunohistochemistry. **Results:** 54 of above patients recurred during follow up. In univariate analysis of disease free survival, the presence of more than three nodal metastases (RR=4,5 p<0,001), grade 3 (RR=2,3 p=0,035), cyclin D1 (RR=3,06 p<0,001) and Her-2 (RR=3,06 p<0,001) amplifications were identified as significant risk factors, together with the negativity of PR (RR=2,1 p=0,013). In multivariate analysis, only clinical stage III (RR=2,6 p=0,003), cyclin D1 (RR=2,7 p=0,001) and Her-2 (RR=2,1 p=0,014) amplifications proved significant. In 77 patients who received adjuvant chemotherapy no statistically significant risk factor was identified. In multivariate analysis of 102 patients without adjuvant chemotherapy only stage III (RR=6,9 p=0,001) and Her-2 amplification (RR=4,5 p=0,001) were confirmed. Conclusion: The advanced clinical stage, cyclin D1 and Her-2 gene amplifications represent factors, predicting the failure of adjuvant tamoxifen treatment, but their predictive value is much lower in patients receiving adjuvant chemotherapy. This fact indicates, they can reflect the common biological aggressiveness of tumor and need not to be tamoxifen specific.

Key words: breast cancer, tamoxifen, Her-2 genes, Cyclin D1, progesterone, receptors, disease free survival.

Úvod

Přibližně 70% karcinomů prsu exprimuje v době diagnózy estrogenové (ER) a/nebo progesteronové (PR) receptory, které jsou dnes nejdůležitějším a jediným standardně vyšetřovaným prediktivním faktorem pro hormonální léčbu. Výsledky klinických studií opakovaně potvrdily přínos adjuvantní léčby tamoxifenem proti placebu. Pětiletá adjuvantní léčba tamoxifenem snižuje mortalitu o 28% a ri-

ziko kontralaterálniho karcinomu prsu o 50% u žen s pozitivními estrogenovými receptory (1). V současnosti však začínají tamoxifen v adjuvantní léčbě nahrazovat inhibitory aromatázy třetí generace, ke kterým patří anastrozol, letrozol a exemestan. Stanovení molekulárnich markerů, které by pomohly predikovat léčebnou odpověď na tamoxifen a byly by vhodné pro rutinní vyšetření, je nanejvýš žádoucí.

Mnohé molekulární a genetické mechanismy mohou hrát roli v mechanizmu rezistence na léčbu tamoxifenem. Nejvíce diskutovaným a zkoumaným genetickým markerem je overexprese onkogenu HER-2 na podkladě amplifikace. Řada prací potvrdila její význam v prognóze onemocnění ale i možné účasti na vzniku rezistence k hormonální léčbě tamoxifenem.(2,3) Tento fakt je vysvětlován interferencí signálních drah receptorů pro růstové faktory (např. EGFR, HER-2, IGFR1 a další), které mohou fosforylovat AF-1 doménu ER. Tato fosforylace může proběhnout jak cestou Ras/MEK/MAPK kinázové signální dráhy, tak i cestou PI3K/Akt kinázové signální dráhy (4). K nejvíce citovaným patří De Laurentiisova metaanalýza 12 klinických studií s hormonální léčbou metastatického onemocnění karcinomu prsu, ve které hodnotili klinickou odpověď v závislosti na expresi HER-2. Metaanalýza prokázala horší klinickou odpověď pacientek s metastatickým onemocněním a overexpresí HER-2 na hormonální léčbu. Relativní riziko pouze pro pacientky léčené tamoxifenem bylo 1.33 (95% CI, 1.20-1.48; $p<0.00001$) (5). Výsledky těchto prací zvažoval ve svém doporučené pro adjuvantní hormonální léčbu postmenopauzálních žen i panel odborníků na konferenci v St Gallen 2007. Iniciální léčbu inhibitorem aromatázy doporučil u pacientek s vyšším rizikem nebo u pacientek s overexpresi HER-2. (6)

Druhým nejčastěji diskutovaným, navíc rutinně stanovovaným markerem rezistence k tamoxifenu je stav PR. Několik klinických studií předpokládá, že vysoká signalizace růstových faktorů může být spojena s poklesem exprese absolutních hladin ER a PR u karcinomu prsu (7). Aprino a spolupracovníci publikovali v roce 2005 zajímavé výsledky retrospektivní studie. 11399 pacientek bylo léčeno v adjuvanci tamoxifenem. U pacientek ER+/PR+ nebyla exprese HER1 ani HER2 spojena s kratším intervalem bez nemoci nebo celkovým přežíváním. Na rozdíl od toho u pacientek s nádory ER+/PR- byla overexprese HER1 i HER2 spojena se signifikantně kratším přežíváním bez nemoci . Výsledky studie podporují hypotézu, že exprese PR je náhradním markerem pro měření aktivity signální dráhy HER1 a/anebo HER2 (8).

Chromozom 11 obsahuje úsek 11q13, který je bohatý na onkogeny a který je amplifikovaný asi u 15% primárních karcinomů prsu (9). Nejvíce studovaným onkogenem této oblasti je CCND1, který kóduje regulační protein buněčného cyklu protein cyklin D1. Kromě toho, že působí na vstup buněčného cyklu do fáze G1 má i funkci, která je nezávislá na cdk (cyclin dependent kinase). Jednou z nich je i aktivace ER alfa nezávislá na ligandu, která se děje přímou vazbou. Může tím způsobit necitlivost nádoru na antiestrogenní léčbu (10).

Předpokládaným mechanizmem podpory tamoxifenové rezistence mutací p53 je zejména „gain of function“, tedy onkogenní účinek některých mutovaných forem p53, projevující se zejména zvýšením exprese EGFR, IGFR, myc a VEGF. Uplatnit se může i pozorované zvýšení exprese MDR-1 (multidrug resistance) genu, případně blokování apoptózy (11).

Další signální dráha, která může ovlivňovat aktivitu ER, je signální dráha PIK3 (phosphatidyl-inositol-3-OH kinase). Jednou z komponent signální dráhy PI3K je serin/threonin protein kináza AKT, aktivace které má proliferační a antiapoptotický účinek. Studie in vitro předpokládají, že Er alfa se může vázat s p85a, která je regulační podjednotkou PI3K, což vede k aktivaci dráhy AKT (12). AKT může být cílem signálních drah i pro jiné receptory, jako IGF-1R, EGFR a HER-2. Vzájemný vztah ER a PIK3 je reciproční a tak PI3K aktivuje AKT, která fosforyluje ER a způsobuje jeho aktivaci (13).

Naším cílem bylo najít prediktivní markery rezistence na tamoxifen. V naší přechozí práci (14) jsme vycházeli z toho, že jejich zastoupení by mělo být relativně vysoké ve vzorcích nádorů, které vyrostly při léčbě tamoxifenem a případně i v primárních nádorech následovaných relapsem, ve srovnání s neselektovanými nádory. Takto jsme identifikovali amplifikaci Her-2, amplifikaci cyklinu D1 a negativitu PR. V nyní předkládané studii jsme se pokusili tyto parametry ověřit multiparametrickou analýzou rozsáhlejšího souboru, zahrnující i sledované pacientky bez dokumentovaného relapsu onemocnění a kompletní klinicko-patologické parametry.

Materiál a metody

Výběr pacientek

Z pacientek klinického stadia I-III operovaných pro primární karcinom prsu na MOÚ v letech 1998-2000 s dostupnými parafinovými bloky primárního nádoru byly vyhledány případy léčené v adjuvanci tamoxifenem pro dobu 5 let nebo do relapsu onemocnění, bez ohledu na případnou adjuvantní chemoterapii a/nebo radioterapii. Takto bylo vyhledáno celkem 192 pacientek. Ve 13 případech nebyla následujícím postupem potvrzena pozitivita estrogenového receptoru (tamoxifen nasazen na základě stanovení z cytosolu) a pro hodnocení bylo dále uvažováno jen 179 pacientek.

Zpracování materiálu

Z vyhledaných archivních parafinových bloků byly pomocí manuálního tissue arrayeru TA1 (A. Fintajsl, Brno) zpracovány složené parafinové bloky (tissue microarrays, dále TMA) na kterých byla běžným způsobem po oživení antigenu v 0,01 M citrátovém pufru pH 6,0 provedena imunohistologická stanovení estrogenového receptoru alfa (dále ER), progesteronového receptoru A+B (dále PR) a Ki67 pomocí králičích monoklonálních protilátek (Labvision, USA). Vazba protilátek byla detekována sekundární protilátkou s polymerovým systémem značeným peroxidázou UltraVision LP (Labvision, USA) a diaminobenzidinem (DAKO, Dánsko). Amplifikace Her-2 a cyklinu D1 byla stanovena pomocí in-situ hybridizace lokus specifických a centromerických DNA prób (Abbott, USA). Podrobnosti o reagenciích a protokolech uvádí tabulka č. 1. V případě nereprezentativnosti nebo ztráty materiálu v TMA bylo vyšetření provedeno na původním bloku.

Imunohistologie	Výrobce, klon	Ředění	Hodnocení
ER	Labvision, SP1	1:4000	5% a více zbarvených jader pozitivní
PR	Labvision, SP2	1:3000	5% a více zbarvených jader pozitivní
Ki67	Labvision SP6	1:3000	Nad 20% zbarvených jader silně pozitivní
Hybridizace	Próba	Protokol	Hodnocení
Her-2/neu	Abbot PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	Dle výrobce	Poměr lokus specifického signálu ku centromerickému nad 2:1 pozitivní (50 jader)
Cyklin D1	Abbott Vysis LSI Cyclin D1/CEP11	Dle výrobce	Poměr lokus specifického signálu ku centromerickému nad 2:1 pozitivní (50 jader)

Tabulka č. 1.: Přehled protilátek, hybridizačních prób a protokolů

Statistická analýza

Byla použita analýza kontingenčních tabulek (Pearsonův chí kvadrát test, případně pro tabulky 2x2 Fisherův test). Pro spojité parametry byl použit t-test a U-test. Křivky přežití byly hodnoceny dle Kaplana-Meiera, jednorozměrnou a vícerozměrnou Coxovou regresí.

Výsledky

Jednorozměrná analýza klinickopatologických a biologických parametrů vzhledem k bezpříznakovému přežití.

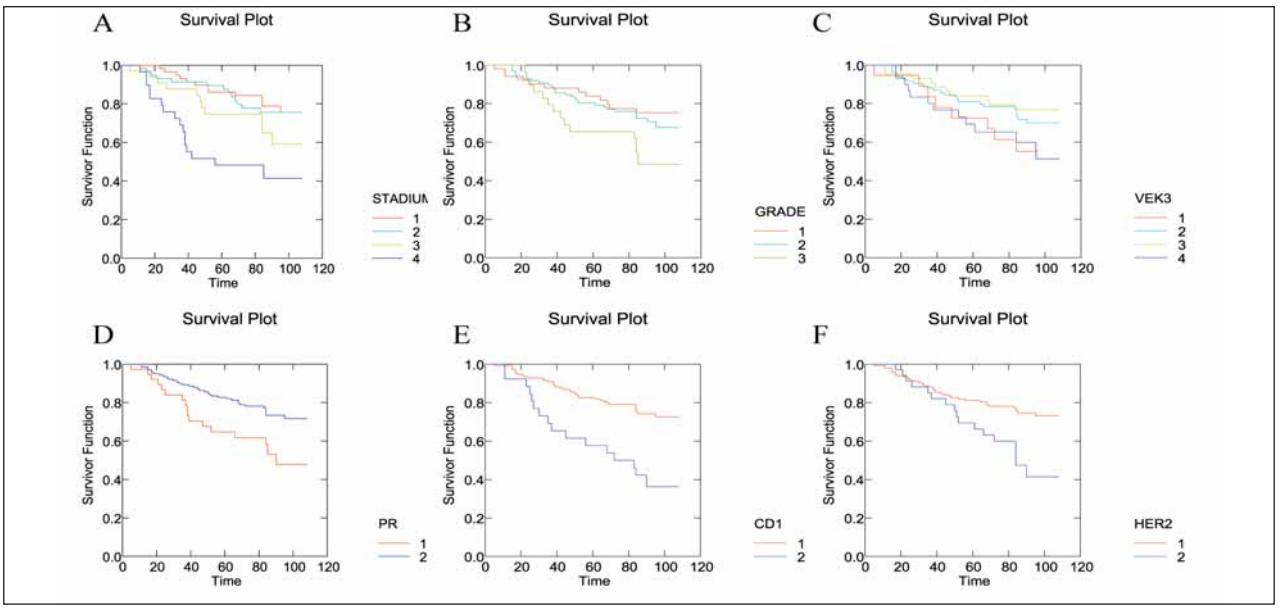
Z jednorozměrné analýzy (tabulka č. 2, obr. č. 1) jednoznačně vyplývá priorita přítomnosti a případně počtu metastáz v axilárních uzlinách jako prediktoru relapsu, případně spolu s gradem. Z biologických parametrů se významně uplatňuje amplifikace genu pro cyklin D1, amplifikace Her-2 a negativita PR. Pacientky pod 46 a nad 70 let mají relapsů relativně více, ve druhé skupině se mohlo uplatnit nepodání adjuvantní chemoterapie (podána zde jen ve 3 případech z 31)

Jednorozměrná analýza však není vzhledem k významným vzájemným závislostem sledovaných parametrů zcela relevantní. V našem souboru šlo zejména o korelaci mezi výskytem uzlinových metastáz na jedné straně a PR negativitou spolu s Her-2 amplifikací na straně druhé. Tyto závislosti jsou přehledně sumarizovány v tabulce č. 3.

Parametr	Škála	Bez relapsu (N=125)	Relabující (N=54)	Statistická významnost
Věk	průměr (SD), medián	58.6 (10.3) 58	57.7 (11.8) 56	p=0.606 (t-test)
	Pod 46	11 (8.8%)	8 (14.8%)	
	46-60	61 (57.5%)	24 (57.1%)	
	61-70	34 (27.2%)	10 (16.4%)	
	Nad 70	19 (15.2%)	12 (31.1%)	
Velikost	pT1	73 (58.4%)	25 (46.3%%)	p=0.145 (Fisher)
	pT2-3	52 (41.6%)	29 (53.7%)	p=0.089 (Kaplan-Meier)
Uzlinové metastázy	pN0	66 (52.8%)	16 (29.6%)	p= 0.003*(chi kvadrát)
	pN1	46 (36.8%)	24 (44.4%)	p<0.001* (Kaplan-Meier)
	pN2+3	13 (10.4%)	14 (25.9%)	
Klinické stadium	I	46 (36.8%)	13 (24.1%)	p=0.001 *(chi kvadrát)
	IIA	45 (40.2%)	13 (34.2%)	p<0.001* (Kaplan-Meier)
	IIB	21 (16.8%)	12 (22.2%)	
	III	13 (10.4%)	16 (29.6%)	
Grade	1-2	109 (87.2%)	40 (74.1%)	p=0.003 *(Fisher)
	3	16 (12.8%)	14 (25.9%)	p=0.031 *(Kaplan-Meier)
Histologický typ	Lobulární + smíšený	45 (36.0%)	17 (22.7%)	p=0.904 (chi kvadrát)
	Duktální NOS	71 (56.8%)	33 (68.2%)	
	Mucinózní a papilární	6 (4.8%)	3 (4.5%)	
	Medulární	3 (2.4%)	1 (4.5%)	
Chemoterapie	Ano	49 (39.2%)	28 (51.9%)	p=0.322 (Fisher)
	Ne	76 (60.8%)	26 (48.1%)	p=0.478 (Kaplan-Meier)
Radioterapie	Ano	101 (80.8%)	43 (72.7%)	p=0.856 (Fisher)
	Ne	24 (19.2%)	11 (27.3%)	p=0.952 (Kaplan-Meier)
PR A+B	Pozitivní	104 (88.1%)	37 (72.4%)	p=0.045* (Fisher)
	Negativní	21 (11.9%)	17 (27.6%)	p=0.012 *(Kaplan-Meier)
Ki67	20% a více	48 (38.4%)	28 (48.1%)	p=0.102 (Fisher)
	pod 20%	77 (61.6%)	26 (54.5%)	p=0.094 (Kaplan-Meier)
Cyklin D1 FISH	Amplifikace	10 (8.0%)	16 (29.6%)	p=0.001*(Fisher)
	Bez amplifikace	115 (92.0%)	38 (70.4%)	p<0.001 *(Kaplan-Meier)
Her-2 FISH	Amplifikace	16 (12.8%)	18 (33.3%)	p=0.003* (Fisher)
	Bez amplifikace	109 (87.2%)	36 (66.7%)	p=0.004 *(Kaplan-Meier)

Tabulka č. 2: Jednorozměrná analýza klinických a biologických parametrů, * p<0.05

Další komplikace do hodnocení může vnášet adjuvantní chemoterapie. Jako příklad lze uvést rozdíl ve vlivu adjuvantní chemoterapie na výskyt relapsu při rozdělení souboru podle přítomnosti uzlinových metastáz (obr. č. 2). Zatímco pacientky bez metastáz přežívají po podání adjuvantní chemoterapie relativně hůře (jedná se zřejmě o důsledek přítomnosti dalších rizikových faktorů pro které byla chemoterapie indikována), u pacientek s pozitivními uzlinami je zřejmý benefit z podání chemoadjuvance. Negativní vliv Her-2 amplifikace na benefit z adjuvantní léčby tamoxifenem se pak uplatňuje pouze u pacientek které

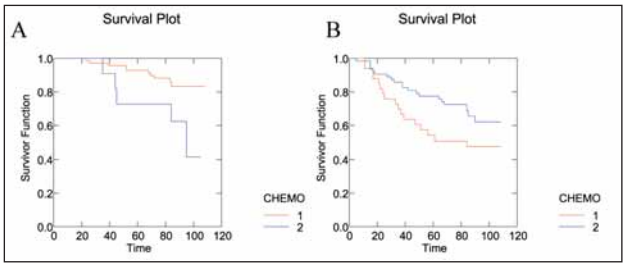


Obr. 1.: Bezpříznakové přežití v souboru podle vybraných parametrů, 1A Stadium 1=I (N=59) 2=IIA (N=58) 3=IIB (N=33) 4=III (N=29) p<0.001, 1B Grade 1 (N=51) 2 (N=98) 3 (N=30) p=0,031 pro 1+2 proti 3, 1C Věk 1 pod 45 (N=19) 2 46-60 (N=85) 3 61-70 (N=44) 4 nad 70 (N=31), 1D PR 1=negativní (N=38) 2=pozitivní (N=141) p=0,012, 1E Cyklin D1 amplifikace 1 ne (N=153) 2 ano (N=26) p<0.001, 1F Her-2 amplifikace 1 negativní (N=145) 2 pozitivní (N=34) p=0,004

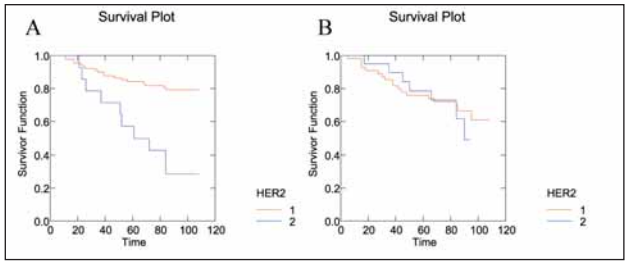
nedostaly chemoterapii (obr. č. 3). Vliv negativity PR (obr. č. 4) a amplifikace cyklinu D1 (obr. č. 5) však zřejmě není na podání adjuvantní chemoterapie tolik závislý.

	Grade	PT	pN	PR neg.	Ki67 vysoké	Cyklin D1 amplifikace
pT	pozitivní					
	p=0.059					
PN (0 proti 1 a více)	pozitivní	pozitivní				
	p=0.289	p<0.001*				
PR negativita	pozitivní	pozitivní	pozitivní			
	p=0.630	p=0.162	p=0.048*			
Ki67 vysoké	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní		
	p<0.001*	p=0.651	p=0.832	p=0.580		
Cyklin D1 amplifikace	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	
	P=0.594	p=0.397	p=0.928	p=0.198	p=0.005*	
Her-2 amplifikace	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní
	P=0.004*	p=0.087	p=0.028*	p<0.035*	P=0.045*	p=0.081

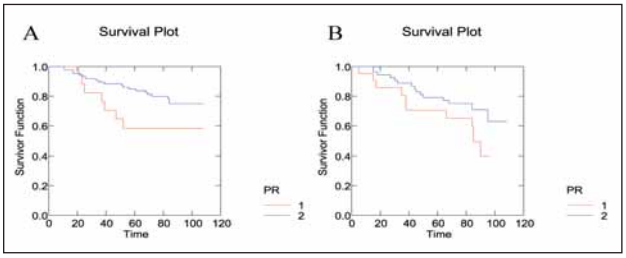
Tabulka 3: Vzájemné korelace klinicko-patologických a biologických parametrů v souboru
V horním řádku je vyznačen přítomný trend závislosti, v dolním hodnota p pro statistickou významnost. * p<0.05



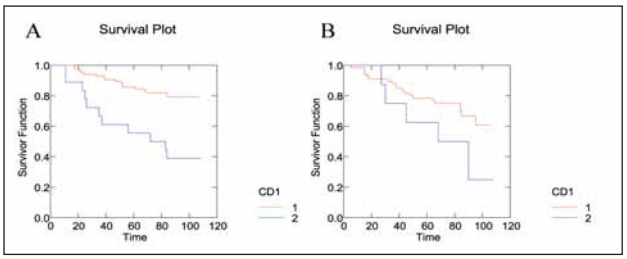
Obr. 2: Souvislost podání adjuvantní chemoterapie s bezpříznakovým přežitím v závislosti na výskytu uzlinových metastáz
Chemoterapie 1 ne 2 ano
2A pN0 p=0,021 (N1=71 N2=11)
2B pacientky s pozitivními uzlinami p=0,051 (N1=33 N2=64)



Obr. 3: Souvislost Her-2 amplifikace s bezpříznakovým přežitím při rozdělení souboru podle podání adjuvantní chemoterapie
Her-2 amplifikace 1 ne 2 ano
3A chemoterapie ne p<0,001 N1=90 N2=14)
3B chemoterapie ano p=0,055 (N1=55 N2=20)



Obr. 4: Souvislost stavu progesteronového receptoru s bezpříznakovým přežitím v závislosti na podání chemoterapie.
PR 1 negativní 2 pozitivní
4A chemoterapie ne p=0,071 (N1=17 N2=87)
4B chemoterapie ano p=0,132 (N1=21 N2=54)



Obr 5: Souvislost amplifikace cyklinu D1 s bezpříznakovým přežitím v závislosti na podání chemoterapie
Cyklin D1 amplifikace 1 ne 2 ano
5A chemoterapie ne p<0.001 (N1=86, N2=18)
5B chemoterapie ano p=0.151 (N1=67 N2=8)

Výsledky jednorozměrné analýzy Coxovou regresí (tabulka č. 4) jsou obdobné. Zvýšení relativního rizika relapsu je zřejmé u pacientek v pokročilejším klinickém stadiu a s vyšším gradem nádoru. Z biologických parametrů se uplatňuje amplifikace cyklinu D1 a Her-2, spolu s PR negativitou.

Parametr	Riziková kategorie / Referenční kategorie	Relativní riziko (95% IS)þ	p-hodnota
Vi k	<45 let / >45 let a <60 let	0.58 (0.26; 1.30)þ	0.187
	>60 let / >45 let a <60 let	1.12 (0.62; 1.99)þ	0.712
Chemoterapie	ano / ne	1.39 (0.82; 2.38)þ	0.223
pT	2-3 / 1	1.56 (0.91; 2.66)þ	0.106
pN	1 / 0	2.09 (1.11; 3.94)þ	**0.022**
	2 / 0	4.55 (2.06; 10.05)þ	**<0.001**
	3 / 0	2.61 (0.87; 7.83)þ	0.086
Grade	2 / 1	1.24 (0.63; 2.44)þ	0.531
	3 / 1	2.30 (1.06; 4.98)þ	**0.035**
Stadium	IIA / I	1.09 (0.50; 2.34)þ	0.835
	IIB / I	1.89 (0.86; 4.15)þ	0.113
	III / I	3.65 (1.75; 7.61)þ	**0.001**
CD1	amplifikace/ bez amplifikace	3.06 (1.70; 5.49)þ	**<0.001**
Her 2	amplifikace/ bez amplifikace	2.42 (1.37; 4.27)þ	**0.002**
PR	negativní/ pozitivní	2.08 (1.17; 3.70)þ	**0.013**
Ki67	nad 20%/ pod 20%	1.60 (0.94; 2.73)þ	0.086

Tabulka 4: Vliv rizikových faktorů na bezpříznakové přežití u pacientek s karcinomem prsu identifikovaný jednorozměrným Coxovým modelem.

Pokud se však pacientky posuzují odděleně podle podání adjuvantní chemoterapie, pak pouze ve skupině bez chemoterapie (tabulka č. 5) jsou rizikové faktory statisticky významné.

Parametr	Riziková kategorie / Referenční kategorie	Relativní riziko (95% IS)	p-hodnota
Věk	<45 let / >45 let a <60 let	0.46 (0.10; 2.22)	0.335
	>60 let / >45 let a <60 let	1.80 (0.76; 4.28)	0.184
pT	2-3 / 1	2.15 (1.02; 4.53)	**0.043**
pN	1/ 0	3.31 (1.37; 7.99)	**0.008**
	2/ 0	9.49 (3.45; 26.15)	**<0.001**
	3 / 0	6.72 (1.48; 30.41)	**0.013**
Grade	2 / 1	0.72 (0.31; 1.67)	0.442
	3 / 1	1.92 (0.70; 5.29)	0.206
Stadium	IIA / I	1.61 (0.60; 4.34)	0.342
	IIB / I	1.85 (0.50; 6.84)	0.356
	III / I	8.79 (3.44; 22.45)	**<0.001**
Cyklin D1	amplifikace/ bez amplifikace	3.99 (1.87; 8.54)	**<0.001**
Her-2	amplifikace/ bez amplifikace	4.37 (2.01; 9.49)	**<0.001**
PR	negativní/ pozitivní	2.11 (0.89; 4.98)	0.088
Ki67	nad 20%/ pod 20%	1.70 (0.81; 3.57)	0.161

Tabulka 5: Vliv rizikových faktorů na bezpříznakové přežití u pacientek s karcinomem prsu identifikovaný jednorozměrným Coxovým modelem – pacientky bez adjuvantní chemoterapie.

Ve skupině s adjuvantní chemoterapií jsou trendy zvýšeného rizika vesměs zachovány, jsou však méně výrazné a v naší sestavě nedosahují statistické významnosti. (tabulka č. 6).

Parametr	Riziková kategorie / Referenční kategorie	Relativní riziko (95% IS)þ	p-hodnota
Vi k	<45 let / >45 let a <60 let	0.67 (0.26; 1.72)þ	0.410
	>60 let / >45 let a <60 let	0.71 (0.21; 2.44)þ	0.592
pT	2-3 / 1	1.00 (0.46; 2.18)þ	0.996
pN	1 / 0	0.74 (0.27; 2.05)þ	0.568
	2 / 0	1.14 (0.31; 4.27)þ	0.842
	3 / 0	0.68 (0.13; 3.52)þ	0.648
Grade	2 / 1	3.40 (0.78; 14.86)þ	0.104
	3 / 1	4.20 (0.89; 19.84)þ	0.070
Stadium	IIB / I + IIA *	1.68 (0.64; 4.43)þ	0.294
	III / I + IIA *	1.60 (0.64; 3.96)þ	0.313
Cyklin D1	amplifikace/ bez amplifikace	2.16 (0.81; 5.73)þ	0.122
Her 2	amplifikace/ bez amplifikace	1.29 (0.56; 3.00)þ	0.550
PR	negativní/ pozitivní	1.87 (0.85; 4.13)þ	0.120
Ki67	nad 20%/ pod 20%	1.27 (0.58; 2.76)þ	0.554

Tabulka 6: Vliv rizikových faktorů na bezpříznakové přežití u pacientek s karcinomem prsu identifikovaný jednorozměrným Coxovým modelem – pacientky s adjuvantní chemoterapií.
* Stadia I a II musela být sloučena z důvodu malého počtu pacientek ve stadiu I.

Vícerozměrná analýza klinickopatologických a biologických parametrů vzhledem k k bezpříznakovému přežití Coxovou regresí.

Do vícerozměrné analýzy byly zahrnuty parametry významné v jednorozměrné analýze. Parametr pN nebyl použit vzhledem k významné korelaci s klinickým stadiem. Při analýze celého souboru (tabulka č. 7) se významné prediktory relapsu redukovaly na klinické stadium, amplifikaci cyklinu D1 a Her-2. Negativita progesteronového receptoru se jako samostatný významný rizikový faktor neprojevila. Ve skupině bez podání adjuvantní chemoterapie však vícerozměrný model identifikoval pouze klinické stadium a Her-2 amplifikaci jako samostatné významné prediktory relapsu (tabulka č. 8).

Parametr	Riziková kategorie / Referenční kategorie	Relativní riziko (95% IS)þ	p-hodnota
Grade	3 / 2 + 1	1.46 (0.77; 2.76)þ	0.241
Stadium	III / I+II	2.62 (1.40; 4.91)þ	**0.003**
Cyklin D1	amplifikace/ bez amplifikace	2.74 (1.51; 4.96)þ	**0.001**
Her 2	amplifikace/ bez amplifikace	2.11 (1.17; 3.83)þ	**0.014**
PR	nad 20%/ pod 20%	1.61 (0.87; 2.96)þ	0.128

Tabulka 7: Vliv rizikových faktorů na bezpříznakové přežití u pacientek s karcinomem prsu identifikovaný vícerozměrným Coxovým modelem v celém souboru.

Parametr	Riziková kategorie / Referenční kategorie	Relativní riziko (95% IS)þ	p-hodnota
Stadium	III / I+II	6.88 (2.73; 17.36)þ	**<0.001**
Cyklin D1	amplifikace/ bez amplifikace	1.57 (0.64; 3.86)þ	0.322
Her 2	amplifikace/ bez amplifikace	4.50 (1.91; 10.60)þ	**<0.001**

Tabulka 8: Vliv rizikových faktorů na bezpříznakové přežití u pacientek s karcinomem prsu identifikovaný vícerozměrným Coxovým modelem u pacientek bez chemoterapie

Závěr

Z klasických prognostických parametrů jsou v jednorozměrné regresní analýze bezpříznakového přežití významnými rizikovými faktory přítomnost více než tří uzlinových metastáz a grade 3 proti gradu 1 a 2. V jednorozměrném modelu zvyšují riziko relapsu z biologických parametrů zejména amplifikace cyklinu D1, amplifikace Her-2 a negativita PR. Při hodnocení jednorozměrné analýzy je však nutné mít na paměti právě vzájemnou korelaci jednotlivých parametrů (tabulka č.3). Např.Her-2 pozitivní nádory mají podle naší analýzy ve vyšším procentu pozitivní axilární uzliny a bývají ve vyšším procentu PR negativní. To se projeví ve výsledcích vícerozměrného Coxova regresního modelu, kde vymizel význam negativity PR a vedle klinického stadia III proti I a II se uplatnila jen amplifikace cyklinu D1 a amplifikace Her-2. Pokud jsme hodnotili pouze pacientky bez adjuvantní chemoterapie, významně se uplatnila pouze amplifikace HER-2.

Diskuse

Při hodnocení prediktivních faktorů ve vztahu k odpovědí na léčbu je potřeba opatrnosti při hodnocení výsledků. Je tedy možné, že tyto biologické markery souvisí spíše s biologickou agresivitou nádoru, nemusí být specifické pro adjuvantní hormonoterapii tamoxifenem, a mohou se uplatnit lépe jako prognostický, než prediktivní faktor. V našem souboru jsme hodnotili prediktivní markery rezistence pouze v souvislosti s tamoxifenem. Více retrospektivních prací potvrdilo prediktivní význam negativity HER-2 ve vztahu k hormonální léčbě tamoxifenem (2,3,5). Je však možné, že se jedná o prediktivní marker rezistence na hormonální léčbu obecně a navíc jde o soubory s omezenou statistickou sílou. Velké adjuvantní klinické studie srovnávající adjuvantní léčbu tamoxifenem a IA (např. studie BIG 1-98) zatím nepotvrdily lepší léčebný výsledek IA u pacientek s overexpresí Her-2 nebo negativitou PR (15). Pouze nová analýza klinické studie ATAC (16) v době sledování 100 měsíců, které výsledky byly prezentovány na SABCS (San Antonio Breast Cancer Symposium) 2007, potvrdila přínos léčby IA proti tamoxifenu v parametru doby do rekurence u pacientek s negativním progesteronovým receptorem a to bez ohledu na základní a léčebné charakteristiky jednotlivých podskupin (stav uzlin, předchozí léčba atd.). Další práce by tedy měla být zaměřena na srovnání bezpříznakového přežití vysoce rizikových pacientek, léčených primárně v adjuvanci IA, s obdobnými pacientkami léčenými tamoxifenem, vzhledem k uvažovaným prediktivním parametrům.

Poděkování:
Paní Zině Hanzelkové za zhotovení imunohistologických a hybridizačních preparátů
Doc. RNDr. Ladislavu Duškovi za provedení analýzy dat Coxovou regresí.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/8270-3

Literatura:

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet 1998;351:1451-1467.
2. De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, et al. Twenty year results of the Naples GUN Randomised Trial: Predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. Clin Cancer Res 2003;9:1039-1046.
3. Dowsett M, Houghton J, Iden C, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. Ann Oncol 2006;17(5):818-26.
4. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science 1995; 270:1491-4.
5. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2005;11:4741-4748.
6. Goldhirsch A, Wood W.C, Gelber R.D, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. Ann Oncol 2007;18:1133-1144.
7. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 2003;95:142-53.
8. Arpino G, Weiss H, Lee AV, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. J Natl Cancer Inst 2005;97:1254-61.
9. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, et al. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2003;78:323-335.
10. Fu M, Wang C, Li Z, et al. Cyclin D1: normal and abnormal functions. Endocrinology 2004;145:5439-5447.
11. Van Oijen MG, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. Clin Cancer Res 2000;6(6):2138-45.
12. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase.Nature 2000 Sep 28;407(6803):538-41.
13. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinasa/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. J Biol Chem 2001;276:9817-9824.
14. Petráková K, Nenutil R, Vyskočil J, et al. Adding the estimation of cyclin D1 gene amplification to the standard panel of predictors in breast carcinoma can significantly imrpove identification of the tumors resistant to tamoxifen. Breast Cancer Res Treat 2007; 106 Suppl 1 Abstract 2O19
15. Coates AS, Keshaviah A, Thürlimann B, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: Update of study BIG 1-98. JCO 2007;10:486-492.
16. Forbes J, Cuzick J, Buzdar A, et al. ATAC: 100 month median follow-up (FU) shows continued superior efficacy and no excess fracture risk for anastrozole (A) compared with tamoxifen. Breast Cancer Res Treat 2007; 106 Suppl 1 Abstract 41: 12-13.

Korespondenční adresa:
Hlavní autor: Katarína Petráková
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7, 65653 Brno
petrakova@mou.cz

Došlo / Submitted: 20. 8. 2008
Přijato / Accepted: 7. 9. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, pruducts, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements" for biomedical papers.